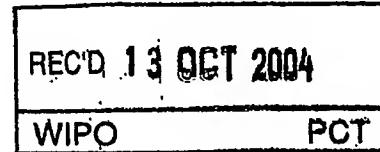
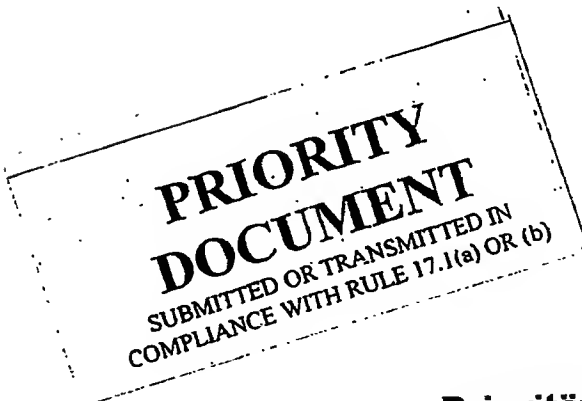


## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

03. 09. 2004

EPO 41 009843



### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 42 670.1 —

Anmeldetag:

16. September 2003 —

Anmelder/Inhaber:

Bayer HealthCare AG,  
51373 Leverkusen/DE

Erstanmelder: Bayer Aktiengesellschaft,  
51368 Leverkusen/DE

Bezeichnung:

Isoliertes Photoprotein mtClytin sowie dessen  
Verwendung

IPC:

C 12 N, C 07 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. Juni 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Hintermeier

BEST AVAILABLE COPY

**Isoliertes Photoprotein mtClytin, sowie dessen Verwendung**

Die Erfindung betrifft das Photoprotein mtClytin, dessen Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sowie die Aktivität und Verwendung des Photoproteins mtClytin.

**Photoproteine**

Als Biolumineszenz bezeichnet man das Phänomen der Lichterzeugung durch Lebewesen. Sie ist das Ergebnis von biochemischen Reaktionen in Zellen, bei denen die chemische Energie in Form von Lichtquanten abgegeben wird (sog. kalte Emission durch Chemolumineszenz). Derartig erzeugtes Licht ist monochromatisch, denn es wird bei einem diskreten Elektronen-Übergang abgestrahlt, kann aber durch sekundäre Leuchtfarbstoffe (z.B. fluoreszierende Proteine bei Leuchtquallen der Gattung Aequora) in längerwellige Spektralbereiche verschoben werden.

Die biologische Funktion ist vielfältig: In der Meerestiefe zwischen 200 und 1000 m (Mesopelagial) leuchten rund 90 % aller Lebewesen. Die Leuchtsignale werden hier zur Partnerwerbung, Täuschung und als Köder eingesetzt. Auch Glühwürmchen und Leuchtkäfer nutzen die Lichtsignale zur Partnersuche. Die Bedeutung des Leuchtens von Bakterien, Pilzen und einzelligen Algen ist dagegen unklar. Es wird vermutet, dass es zur Koordination von vielen Einzel-Individuen einer großen Population eingesetzt wird oder eine Art biologische Uhr darstellt.

Eine Vielzahl an Coelenteraten ist biolumineszent (Morin et al., 1974). Diese Organismen emittieren blaues oder grünes Licht. Das 1962 als erstes Licht produzierendes Protein identifizierte Aequorin aus Aequoria victoria (Shimomura et al., 1969) emittierte als isoliertes Protein ein blaues Licht und nicht grünes Licht wie phänotypisch beobachtet bei Aequoria victoria. Später konnte das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus Aequoria victoria isoliert werden, das aufgrund der Anregung durch das Aequorin die Meduse phänotypisch grün erscheinen lässt (Johnson

et al., 1962; Hastings et al., 1969; Inouye et al., 1994). Als weitere Photoproteine konnten noch Clytin (Inouye et al., 1993), Mitrocomin (Fagan et al., 1993) und Obelin (Illarionov et al., 1995) identifiziert und beschrieben werden.

- 5 **Tabelle 1:** Übersicht über einige Photoproteine. Angegeben sind der Name, der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist und die Identifikationsnummer (Acc. No.) des Datenbankeintrages.

Name	Organismus	Identifikations Nr.
Obelin	Obelia geniculata	AAL86372
Clytin	Clytia gregaria	CAA49754
Aequorin	Aequorea macrodactyla	AAK02061
Aequorin	Aequorea parva	AAK02060
Mitrocomin	Mitrocoma cellularia	AAA29298
Pholasin	Pholas dactylus	AAM18085
?	Symplectoteuthis oualaniensis	AX305029

- 10 **Tabelle 2:** Übersicht über einige Photoproteine. Angegeben sind der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist, der Name des Photoproteins und eine Auswahl an Patenten bzw. Anmeldungen.

Organismus	Fluoreszierendes Protein	Patent / Anmeldung
Obelia geniculata	Obelin	WO03006497
Clytia gregaria	Clytin	WO03006497
Aequoria victoria	Aequorin	WO200168824 US-0908909 US 6,152,358 JP-0176125
Pholas dactylus	Pholasin	WO0028025 GB-0024357

5 Biolumineszenz wird heute in der Technik vielfältig genutzt, z.B. in Form von Bio-Indikatoren für Umweltverschmutzung oder in der Biochemie zum empfindlichen Nachweis von Proteinen, zur Quantifizierung bestimmter Verbindungen oder als sogenannte "Reporter" bei der Untersuchung zellulärer Gen-Regulation.

10 Die Photoproteine unterscheiden sich nicht nur aufgrund ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sondern auch aufgrund ihrer biochemischen und physikalischen Eigenschaften.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Veränderung der Aminosäuresequenz von Photoproteinen die physikalischen und biochemischen Eigenschaften verändert werden können. Beispiele von mutagenisierten Photoproteinen sind in der Literatur beschrieben (US 6,495,355; US 5,541,309; US 5,093,240; Shimomura et al., 1986).

15 Die Lichterzeugung durch die oben genannten Photoproteine erfolgt durch die Oxidation von Coelenterazin (Haddock et al., 2001; Jones et al., 1999).

### **Reportersysteme**

20 Als Reporter- oder Indikatorgen bezeichnet man generell Gene, deren Genprodukte sich mit Hilfe einfacher biochemischer oder histochemischer Methoden leicht nachweisen lassen. Man unterscheidet mindestens 2 Typen von Reportergenen.

- 25 1. Resistenzgene. Als Resistenzgene werden Gene bezeichnet, deren Expression einer Zelle die Resistenz gegen Antibiotika oder andere Substanzen verleiht, deren Anwesenheit im Wachstumsmedium zum Zelltod führt, wenn das Resistenzgen fehlt.
- 30 2. Reportergene. Die Produkte von Reportergenen werden in der Gentechnologie als fusionierte oder unfusionierte Indikatoren verwendet. Zu den ge-

bräuchlichsten Reportergenen gehören die beta-Galaktosidase (Alam et al., 1990), alkalische Phosphatase (Yang et al., 1997; Cullen et al., 1992), Luciferasen und andere Photoproteine (Shinomura, 1985; Phillips GN, 1997; Snowdowne et al., 1984).

5

Als Lumineszenz bezeichnet man die Abstrahlung von Photonen im sichtbaren Spektralbereich, wobei diese durch angeregte Emitttermoleküle erfolgt. Im Unterschied zur Fluoreszenz wird hierbei die Energie nicht von Außen in Form von Strahlung kürzerer Wellenlänge zugeführt.

10

Man unterscheidet Chemolumineszenz und Biolumineszenz. Als Chemolumineszenz bezeichnet man eine chemische Reaktion, die zu einem angeregten Molekül führt, das selbst leuchtet, wenn die angeregten Elektronen in den Grundzustand zurückkehren. Wird diese Reaktion durch ein Enzym katalysiert, spricht man von Biolumineszenz. Die an der Reaktion beteiligten Enzyme werden generell als Luziferasen bezeichnet.

15

### **Einordnung der Spezies *Clytia gregaria***

20

Cnidaria→Leptomedusae→Campanulariidae→ *Clytia gregaria*

Die Spezies *Clytia gregaria* gehört zu den Cnidaria, speziell zu den Medusen. Der biolumineszente bzw. fluoreszente Phänotyp wurde bereits 1998 beschrieben (Ward et al., 1998).

25

### **Isolierung der cDNA**

30

Zur Untersuchung der Biolumineszenz-Aktivität der Spezies *Clytia gregaria* wurden Exemplare im Weißen Meer (Biologische Station Kartesh, Russland) gefangen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Erstellung der cDNA-Bibliotheken von *Clytia*

gregaria, wurde die poly(a)+ RNA mit Hilfe des „Straight A“ Isolationsmethode von Novagen (USA) isoliert.

5 Zur Herstellung der cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden 1 µg RNA mit Reverser Transkriptase (Superscript Gold II) nach folgendem Schema inkubiert:

PCR	1.	30	Sekunden	95°C
	2.	6	Minuten	68°C
	3.	10	Sekunden	95°C
	4.	6	Minuten	68°C

17 Zyklen von Schritt 4 nach Schritt 3

15 Die Reaktionsprodukte wurden zur Inaktivierung der Polymerase für 30 Minuten bei 37°C mit Proteinase K inkubiert und die cDNA mit Ethanol präzipitiert. Die Expression-cDNA Bank wurde mit Hilfe des „SMART cDNA Library Construction Kits“ der Firma Clontech (USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Klonierung erfolgte in den Expressionsvektor pTriplEx2 (Clontech; USA). Die Expressionsvektoren wurden durch Elektroporation in Bakterien des Stammes E. coli XL1-Blue transformiert.

25 Die Bakterien wurden auf LB-Nährböden plattiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Replikaplattierung durchgeführt, indem die Bakterien mit Hilfe eines Nitrocellulosefilters auf eine weitere Nährbodenplatte übertragen wurden. Die Replikaplatte wurde wiederum für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die gewachsenen Bakterienkolonien in LB-Flüssigmedium übertragen. Nach der Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) wurden die Bakterien für 4 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden durch 30 Zentrifugation geerntet und die Bakterienmasse in 0,5 ml Aufschlusspuffer (5 mM

EDTA, 20 mM Tris-HCL pH 9,0) bei 0°C resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Bakterien durch Ultraschall.

5 Die Lysate wurden nach der Zugabe von Coelenterazine (Endkonzentration 10E-07 M) bei 4°C für 3 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Biolumineszenz nach der Zugabe von Calciumchlorid (Endkonzentration 20 mM) im Luminometer.

10 Es wurde ein Photoprotein identifiziert. Das Photoprotein wurde als mtClytin bezeichnet. Im Folgenden wird das Photoprotein mtClytin im einzelnen dargestellt.

#### **mtClytin**

15 Das Photoprotein mtClytin zeigt die höchste Homologie auf Aminosäureebene zu Clytin aus *Clytia gregaria* mit einer Identität von 87 % und zu Obelin aus *Obelia geniculata* eine Identität von 77 % (gezeigt in Beispiel 8; Figur 8). Die Homologie von 87 % - in Bezug auf Clytin - ergibt sich am C-terminalen Ende des Proteins, wobei verteilt über das gesamte Protein mehrfache Aminosäureaustausche zu identifizieren sind. Auf Nukleinsäureebene liegt die Identität unter 30 % (gezeigt in 20 Beispiel 7; Figur 7). Zum Sequenzvergleich wurde das BLAST-Verfahren verwendet (Altschul et al., 1997).

25 Das Photoprotein Clytin-2 zeigt die höchste Homologie auf Aminosäureebene zu Clytin aus *Clytia gregaria*. Die Sequenz weist jedoch eine Reihe an Abweichungen in der Aminosäuresequenz auf, die im Beispiel 11 (Figur 9) dargestellt sind. Diese Abweichungen können zur veränderten physikochemischen, biochemischen und biolumineszenten Eigenschaften führen. Das Photoprotein Clytin-2 besitzt kein Signalpeptid (wie in Beispiel 10 gezeigt).

30 Das Photoprotein mtClytin besitzt ein Signalpeptid, das zur Translokation des Photoproteins in Mitochondrien führen kann. Die Identifizierung des Signalpeptides

erfolgte durch das Computerprogramm MITOPROT (Claros et al., 1996) (gezeigt in Beispiel 10). Das durch MITOPROT ermittelte Signalpeptid ist in SEQ ID NO: 3 angegeben. Das Photoprotein mtClytin ist das erste Photoprotein, bei dem ein natürliches Signalpeptid zur Translokation in Mitochondrien identifiziert werden konnte.

Die Erfindung betrifft auch funktionelle Äquivalente von mtClytin. Funktionelle Äquivalente sind solche Proteine, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften haben und mindestens 70 % homolog sind zu SEQ ID NO: 2. Bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 80 % oder 90 %. Besonders bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 95 %.

Die Erfindung betrifft auch die funktionellen Äquivalente des Signalpeptides von mtClytin. Funktionelle Äquivalente sind solche Proteine oder Peptide, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften haben und mindestens 70 % homolog sind zu SEQ ID NO: 3. Bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 80 % oder 90 %. Besonders bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 95 %.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reportergen für zelluläre Systeme speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren oder für induzierbare Systeme.

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich auch als Fusion mit Reportergenen als fusionierte Reportergen für zelluläre Systeme speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren oder für induzierbare Systeme.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich auch als Reportergen durch Markierung, Identifizierung und Charakterisierung von Zellorganellen speziell für Mitochondrien.

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich auch zur Fusion mit Peptiden oder Proteinen zur Translokation in Zellorganellen speziell Mitochondrien.

Das Photoprotein von mtClytin eignet sich auch als Reportergen zur Bestimmung von Parametern innerhalb und außerhalb von Zellorganellen, speziell von Mitochondrien, speziell von Kalziumkonzentrationen.

5

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Reportergen zur Bestimmung von Parametern innerhalb und außerhalb von Zellorganellen, speziell von Mitochondrien, speziell von Kalziumkonzentrationen.

10

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reportergen in bakteriellen und eukaryotischen Systemen speziell in Säugerzellen, in Bakterien, in Hefen, in Bakulo, in Pflanzen.

15

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reportergen für zelluläre Systeme in Kombination mit biolumineszenten oder chemolumineszenten Systemen, speziell Systemen mit Luziferasen, mit Oxygenasen, mit Phosphatasen.

20

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Reportergen für zelluläre Systeme in Kombination mit biolumineszenten oder chemolumineszenten Systemen, speziell Systemen mit Luziferasen, mit Oxygenasen, mit Phosphatasen.

25

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Fusionsprotein speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren, für Proteinasen, für Kinasen, für Phosphodiesterasen, für Hydrolasen, für Peptidasen, für Transferasen, für Membranproteine und für Glykoproteine.

30

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Fusionsprotein speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren, für Proteinasen, für Kinasen, für Phosphodiesterasen, für Hydrolasen, für Peptidasen, für Transferasen, für Membranproteine und für Glykoproteine.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Immobilisierung speziell durch Antikörper, durch Biotin, durch magnetische oder magnetisierbare Träger.

5 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Protein für Systeme des Energietransfers speziell der FRET- (Fluorescence Resonance Energy Transfer), BRET- (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), FET (field effect transistors), FP (fluorescence polarization), HTRF (Homogeneous time-resolved fluorescence) Systemen.

10 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Markierung von Substraten oder Liganden speziell für Proteasen, für Kinasen, für Transferasen.

15 Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Expression in bakteriellen Systemen speziell zur Titerbestimmung, als Substrat für biochemische Systeme speziell für Proteinasen und Kinasen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Marker speziell gekoppelt an Antikörper, gekoppelt an Enzyme, gekoppelt an Rezeptoren, gekoppelt an Ionenkanäle und andere Proteine.

20 Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Marker speziell gekoppelt an Antikörper, gekoppelt an Enzyme, gekoppelt an Rezeptoren, gekoppelt an Ionenkanäle und andere Proteine.

25 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reportergen bei der pharmakologischen Wirkstoffsuche speziell im HTS (High Throughput Screening).

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich auch als Reportergen bei der pharmakologischen Wirkstoffsuche speziell im HTS (High Throughput Screening).

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Komponente von Detektionssystemen speziell für ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), für Immunohistochemie, für Western-Blot, für die konfokale Mikroskopie.

- 5 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Marker für die Analyse von Wechselwirkungen speziell für Protein-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-RNA-Wechselwirkungen, für RNA-RNA-Wechselwirkungen, für RNA-Protein-Wechselwirkungen (DNA: deoxyribonucleic acid; RNA: ribonucleic acid; ).

10

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Marker oder Fusionsprotein für die Expression in transgenen Organismen speziell in Mäusen, in Ratten, in Hamstern und anderen Säugetieren, in Primaten, in Fischen, in Würmern, in Pflanzen.

- 15 Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Marker oder Fusionsprotein für die Expression in transgenen Organismen speziell in Mäusen, in Ratten, in Hamstern und anderen Säugetieren, in Primaten, in Fischen, in Würmern, in Pflanzen.

20

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Marker oder Fusionsprotein zur Analyse der Embryonalentwicklung.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Marker über einen Kopplungsvermittler speziell über Biotin, über NHS (N-hydroxysulfosuccimide), über CN-Br.

25

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reporter gekoppelt an Nukleinsäuren speziell an DNA, an RNA.

30

Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reporter gekoppelt an Proteine oder Peptide.

Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch als Reporter gekoppelt an Proteine oder Peptide.

5 Das Photoprotein mtClytin eignet sich als Reporter zur Messung von intra- oder extrazellulären Calciumkonzentrationen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Charakterisierung von Signalkaskaden in zellulären Systemen.

10 Das an Nukleinsäuren oder Peptiden gekoppelte Photoprotein mtClytin eignet sich als Sonde speziell für Northern-Blots, für Southern-Blots, für Western-Blots, für ELISA, für Nukleinsäuresequenzierungen, für Proteinanalysen, Chip-Analysen.

15 Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Markierung von pharmakologischen Formulierungen speziell von infektiösen Agentien, von Antikörpern, von „small molecules“.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich für geologische Untersuchungen speziell für Meeres-, Grundwasser- und Flussströmungen.

20 Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Expression in Expressionssystemen speziell in in-vitro Translationssystemen, in bakteriellen Systemen, in Hefe Systemen, in Bakulo Systemen, in viralen Systemen, in eukaryotischen Systemen.

25 Das Signalpeptid von mtClytin eignet sich als Fusionspeptid auch zur Expression in Expressionssystemen speziell in in-vitro Translationssystemen, in bakteriellen Systemen, in Hefe Systemen, in Bakulo Systemen, in viralen Systemen, in eukaryotischen Systemen.

Das Photoprotein mtClytin eignet sich zur Visualisierung von Geweben oder Zellen bei chirurgischen Eingriffen speziell bei invasiven, bei nicht-invasiven, bei minimal-invasiven.

- 5 Das Photoprotein mtClytin eignet sich auch zur Markierung von Tumorgeweben und anderen phänotypisch veränderten Geweben speziell bei der histologischen Untersuchung, bei operativen Eingriffen.

- 10 Die Erfindung betrifft auch die Reinigung des Photoprotein mtClytin speziell als wildtyp Protein, als Fusionsprotein, als mutagenisiertes Protein.

Die Erfindung betrifft auch die Reinigung des Signalpeptides von mtClytin speziell als wildtyp Protein, als Fusionsprotein, als mutagenisiertes Protein.

- 15 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein mtClytin auf dem Gebiet der Kosmetik speziell von Badezusätzen, von Lotionen, von Seifen, von Körperfarben, von Zahncreme, von Körperpudern.

- 20 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein mtClytin zur Färbung speziell von Nahrungsmitteln, von Badezusätzen, von Tinte, von Textilien, von Kunststoffen.

- 25 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein mtClytin zur Färbung von Papier speziell von Grußkarten, von Papierprodukten, von Tapeten, von Bastelartikeln.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein mtClytin zur Färbung von Flüssigkeiten speziell für Wasserpistolen, für Springbrunnen, für Getränke, für Eis.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein mtClytin zur Herstellung von Spielwaren speziell von Fingerfarbe, von Schminke.

5 Die Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 2 kodieren.

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 3 kodieren.

10 Die Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 6 kodieren.

Die Erfindung betrifft das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 2 offenbart ist.

15 Die Erfindung betrifft das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 3 offenbart ist.

20 Die Erfindung betrifft das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 6 offenbart ist.

Die Erfindung bezieht sich des weiteren auf Nukleinsäuremoleküle, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 25 a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 2 beinhaltet;
- b) Nukleinsäuremolekülen, welche die durch SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz enthalten;

- c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist;

5

Eine stringente Hybridisierung von Nukleinsäuremolekülen kann zum Beispiel in einer wässrigen Lösung, die 0,2 x SSC (1x standard saline-citrate = 150 mM NaCl, 15 mM Trinatriumcitrat) enthält, bei 68°C durchgeführt werden (Sambrook et al., 1989).

10

- d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;

15

- e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und deren Proteinprodukt die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist; und

20

- f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und deren Proteinprodukt die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist.

25

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle, die eine Sequenzhomologie von mindestens 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % oder 60 % zu SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 5 aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, welches die Eigenschaften eines Photoproteins besitzt.

30

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle, die eine Sequenzhomologie von mindestens 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % oder 60 % zu SEQ ID NO: 4 aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, welches die Eigenschaften eines Signal- bzw. Leaderpeptides besitzt.

Die Erfindung betrifft die oben genannten Nukleinsäuremoleküle, bei denen die Sequenz einen funktionalen Promotor 5' zu der das Photoprotein kodierenden Sequenz bzw. der das Leader- oder Siganlsequenz kodierenden Sequenz enthält.

- 5 Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle wie vorhergehend beschrieben, die Bestandteil von rekombinanten DNA oder RNA Vektoren sind.

Die Erfindung betrifft Organismen, die einen solchen Vektor enthalten.

- 10 Die Erfindung bezieht sich auf Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zur DNA oder RNA Sequenz der mtClytin Moleküle oder der weiteren erfindungsgemäßen Molekülen sind.

- 15 Die Erfindung betrifft Photoproteine, die durch die vorhergehend beschriebenen Nukleotidsequenzen kodiert sind.

Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Expression der erfindungsgemäßen Photoprotein Polypeptide in Bakterien, eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.

- 20 Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines erfindungsgemäßen Photoprotein Polypeptides.

- 25 Die Erfindung bezieht sich auf Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Photoproteine erkannt werden.

- 30 Die Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, für Photoproteine kodierende Nukleinsäuren als Marker- oder Reportergene, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

Die Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Photoproteine bzw. eine erfindungsgemäße, für ein Photoprotein kodierende Nukleinsäure als Marker oder Reporter bzw. als Marker- oder Reportergen.

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung des Photoproteins mtClytin (SEQ ID NO: 2) bzw. die Verwendung einer für das Photoprotein mtClytin kodierenden Nukleinsäure als Marker oder Reporter bzw. als Marker oder Reportergen insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

10 Die Erfindung betrifft die Verwendung der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure als Marker- oder Reportergen, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

15 Die Erfindung betrifft die Verwendung des in SEQ ID NO: 6 dargestellten Peptides und der hierzu zugrundeliegenden Nukleinsäuresequenz SEQ ID NO: 5 als Marker- oder Reportergen, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

20 Gegenstand der Erfindung sind auch polyklonale oder monoklonale Antikörper, welche ein erfindungsgemäßes Polypeptid erkennen.

Die Erfindung betrifft auch monoklonale oder polyklonale Antikörper, die das Photoprotein mtClytin (SEQ ID NO:2) bzw. das Photoprotein Clytin-2 (SEQ ID NO: 6) erkennen.

25 Die Erfindung betrifft auch monoklonale oder polyklonale Antikörper, die das Signalpeptide des Photoprotein mtClytin (SEQ ID NO: 3) erkennen.

30 Des weiteren betrifft die Erfindung ein Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 5
- a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 3 beinhaltet;
  - b) Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 4 dargestellte Sequenz beinhaltet;
  - c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- oder Leaderpeptides aufweist;
  - d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
  - e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 4 zeigen, und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- oder Leaderpeptides aufweist; und
  - f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65 % zu SEQ ID NO: 4 zeigen, und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- oder Leaderpeptides aufweist.
- 10
- 15

Ebenfalls Bestandteil der Erfindung ist ein Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- 20
- a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 6 beinhaltet;
  - b) Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 5 dargestellte Sequenz beinhaltet;
  - c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist;
  - d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
- 25
- 30

- e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 5 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist; und
- f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 80 % zu SEQ ID NO: 5 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist.

Die Erfindung betrifft auch eine Nukleinsäure wie in den vorangehenden Absätzen beschrieben, welche einen funktionalen Promotor 5' zur kodierenden Sequenz enthält.

Die Erfindung beinhaltet rekombinante DNA oder RNA Vektoren, welche die vorangehend beschriebenen Nukleinsäuren enthalten.

- Organismen, die einen wie vorangehend beschriebenen Vektor enthalten, sind ebenfalls erfindungsgemäß.

Die Erfindung bezieht sich auch auf Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zu einer Teilsequenz eines wie oben beschrieben Nukleinsäuremoleküls sind.

Ein Polypeptid, das durch eine wie oben beschriebene Nukleinsäuresequenz kodiert ist, ist ebenfalls Teil der Erfindung.

- Erfindungsgemäß ist auch ein Verfahren zur Expression der vorangehend genannten Polypeptide in Bakterien, viralen Zellen, Hefen oder eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.

- Bestandteil der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines erfindungsgemäßen Polypeptides.

Erfindungsgemäß sind ebenfalls Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein mtClytin erkannt werden.

- 5 Bestandteil der Erfindung sind weiterhin Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein Clytin-2 erkannt werden.

- 10 Ebenfalls Bestandteil der Erfindung sind Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das durch SEQ ID NO: 3 offenbarte Signal- bzw. Leaderpeptid erkannt werden.

- 15 Auch erfindungsgemäß sind Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein offenbart durch SEQ ID NO:6 (Clytin-2) erkannt werden.

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure als Marker- oder Reportergen.

- 20 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Photoproteins als Marker oder Reporter.

- 25 Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung einer Nukleinsäure, welche die als SEQ ID NO: 4 dargestellte Sequenz, bzw. eine Sequenz mit 60 %iger, 65 %iger, 70 %iger, 75 %iger, 80 %iger, 85 %iger oder 90 %iger, vorzugsweise mit 95 %iger Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 4, beinhaltet, als Signal- bzw. Leadersequenz.

- 30 Auch ist die Verwendung eines Peptides, welches die als SEQ ID NO: 3 dargestellte Sequenz, bzw. eine Sequenz mit 60 %iger, 65 %iger, 70 %iger, 75 %iger, 80 %iger, 85 %iger oder 90 %iger, vorzugsweise mit 95 %iger Sequenzidentität zu SEQ ID NO: 3 beinhaltet, als Signal- bzw. Leaderpeptid Bestandteil der Erfindung.

Ebenfalls Erfindungsgemäß ist die in den zwei vorangehenden Absätzen beschriebene Verwendung, um an das Signal- bzw. Leaderpeptid fusionierte Proteine in Zellorganellen zu transportieren.

5

Bestandteil der Erfindung ist auch die im vorangehenden Absatz beschriebene Verwendung, wobei es sich bei den Zellorganellen um Mitochondrien handelt.

10

Bestandteil der Erfindung ist auch die im vorletzten Absatz beschriebene Verwendung, wobei es sich bei den Zellorganellen um das endoplasmatische Retikulum (ER) handelt.

15

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der als SEQ ID NO: 4 dargestellten Nukleinsäuresequenz als Signal- bzw. Leadersequenz.

Auch ist die Verwendung des als SEQ ID NO: 3 dargestellten Peptides, welches die dargestellte Sequenz beinhaltet, als Signal- bzw. Leaderpeptid Bestandteil der Erfindung.

20

Ebenfalls Erfindungsgemäß ist die in den zwei vorangehenden Absätzen beschriebene Verwendung, um ein an das Signal- bzw. Leaderpeptid fusioniertes Protein in Zellorganellen zu transportieren.

25

Bestandteil der Erfindung ist auch die im vorangehenden Absatz beschriebene Verwendung, wobei es sich bei den Zellorganellen um Mitochondrien handelt.

Bestandteil der Erfindung ist auch die im vorletzten Absatz beschriebene Verwendung, wobei es sich bei den Zellorganellen um das endoplasmatische Retikulum (ER) handelt.

30

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Polypeptide als Reporterproteine in der pharmakologischen Wirkstoffsuche ist ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

5 Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren als Reportergene in der pharmakologischen Wirkstoffsuche.

### **Expression der erfindungsgemäßen Photoproteine**

10 Als Expression bezeichnet man die Produktion eines Moleküls, das nach dem Einbringen des Gens in eine geeignete Wirtszelle die Transcription und Translation des in einen Expressionsvektor klonierte Fremdgen erlaubt. Expressionsvektoren enthalten die für die Expression von Genen in Zellen von Prokaryonten oder Eukaryonten erforderlichen Kontrollsignale.

15 Expressionsvektoren können prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen konstruiert werden. Bei den sogenannten Transkriptionsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als authentisches, biologisch aktives Protein synthetisiert. Der Expressionsvektor trägt hierzu alle zur Expression benötigten 5'- und 3'-Kontrollsignale.

20 Bei den sogenannten Translationsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als Hybridprotein zusammen mit einem anderen Protein exprimiert, das sich leicht nachweisen lässt. Die zur Expression benötigten 5'- und 3'-Kontrollsignale inklusive des Startcodons und eventuell ein Teil der für die N-terminalen Bereiche des zu bildenden Hybridproteins codierenden Sequenzen stammen vom  
25 Vektor. Der zusätzliche eingeführte Proteinteil stabilisiert nicht nur in vielen Fällen das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein vor dem Abbau durch zelluläre Proteasen, sondern lässt sich auch zum Nachweis und zur Isolierung des gebildeten Hybridproteins einsetzen. Die Expression kann sowohl transient, als auch stabil  
30 erfolgen. Als Wirtsorganismen eignen sich sowohl Bakterien, Hefen, Viren als auch eukaryotische Systeme.

### **Reinigung der erfindungsgemäßen Photoproteine**

5 Die Isolierung von Proteinen (auch nach Überexpression) wird häufig als Proteinreinigung bezeichnet. Zur Proteinreinigung steht eine Vielzahl an etablierten Methoden und Verfahren zur Verfügung.

10 Die Fest-Flüssig-Trennung ist eine Grundoperation bei Proteinisolierungen. Sowohl bei der Abtrennung der Zellen vom Kulturmedium als auch bei der Klärung des Rohextraktes nach Zellaufschluss und Entfernung der Zelltrümmer, bei der Abtrennung von Niederschlägen nach Fällungen usw. ist der Verfahrensschritt erforderlich. Er erfolgt durch Zentrifugation und Filtration.

15 Durch Gewinnung intrazellulärer Proteine muss die Zellwand zerstört bzw. durchlässig gemacht werden. Je nach Maßstab und Organismus werden dazu Hochdruckhomogenisatoren oder Rührwerkskugel- bzw. Glasperlenmühlen eingesetzt. Im Labormaßstab kommen u.a. mechanische Zellintegrationen und Ultraschallbehandlung zum Einsatz.

20 Sowohl für extrazelluläre als auch intrazelluläre Proteine (nach Zellaufschluss) sind verschiedene Fällungsverfahren mit Salzen (insbesondere Ammoniumsulfat) oder organischen Lösungsmitteln (Alkohole, Aceton) eine schnelle und effiziente Methode zur Konzentration von Proteinen. Bei der Reinigung intrazellulärer Proteine ist die Entfernung der löslichen Nukleinsäuren erstrebenswert (Fällung z.B. mit  
25 Streptomycin- oder Protaminsulfat). Bei der Gewinnung extrazellulärer Proteine werden häufig Träger (z.B. Stärke, Kieselgur) vor Zugabe der Fällungsmittel zugesetzt, um besser handhabbare Niederschläge zu erhalten.

30 Für die Feinreinigung stehen zahlreiche chromatographische und Verteilungsverfahren zur Verfügung (Absorptions- und Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie, Elektrophoresen). Eine Säulenchromatographie wird

auch im technischen Maßstab angewandt. Für den Labormaßstab ist vor allem die Affinitätschromatographie von Bedeutung, die Reinigungsfaktoren bis zu mehreren 100 pro Schritt ermöglicht.

5 Extrazelluläre Proteine fallen in relativ verdünnten Lösungen an. Sie müssen ebenso wie extrazelluläre Proteine vor ihrer weiteren Verwendung konzentriert werden. Neben den schon erwähnten Verfahren hat sich – auch im industriellen Maßstab – die Ultrafiltration bewährt.

10 Anorganische Salze als Begleitstoffe von Proteinen sind für spezifische Anwendungen häufig unerwünscht. Sie können u.a. durch Gelfiltration, Dialyse und Diafiltration entfernt werden.

15 Zahlreiche Proteine kommen als Trockenpräparate zum Einsatz. Als Trocknungsverfahren sind die Vakuum-, Gefrier- und Sprühtrocknung von Bedeutung.

### **Nukleotid- und Aminosäuresequenzen**

20 Das Photoprotein mtClytin wird durch die folgende Nukleotidsequenz kodiert (SEQ ID NO: 1):

5`-

gacagataaaaaattcactccttagattattttagtgaataagagaaaaaaggataa  
 gaaatcaagatgcaaagggtttacaaatcgtcttctttccatgctcggctttacgtgca  
 agatcaagattgcaacgcacggcaaattttcacaccagcatactcttggctacagat  
 5 tcaaaatacgcggtcaaactcgatcctgattttgcaaattccaaatggatcaacaga  
 cacaaatztatgttcaactttttggacataaacggtaaggggaaaatcacattagat  
 gaaatcgtctccaaagcttcagacgacattttgtgctaaactggatgcaacaccagaa  
 cagaccaaacgtcaccaggatgctggtgaagcctttttcaagaaaatgggcatggat  
 tatggtaaagaagttgcattcccagaattttattaagggatgggaagagttggccgaa  
 10 cagacttggaaactctggtctcaaaacaaaagtacattgatccgtgaatggggagat  
 gctgttttcgacatttttcgacaaagacgcaagtggctcaatcagtttagacgaatgg  
 aaggcttacggacgaatctctggaatctgtccatcagacgaagacgctgagaagacg  
 ttcaaacattgtgattttggacaacagtggcaaacttgatgttgatgagatgaccagg  
 caacatntaggtctctggtacacattggatccaacttctgatgggtctttatggcaat  
 15 tttgttccctaagaagcgttcagttaaaaacgctaaacattgttcagttgtaaaatt  
 atattcattttcattttcgtaaaattagatattataaatttgatcataaattgtatc  
 catgttgtagactaaataagactcggcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa  
 -3`.

20 Daraus ergibt sich eine Aminosäuresequenz von (SEQ ID NO: 2):

MQRFTNRLLSMSALRARSRLQRTANFHTSILLATDSKYAVKLDPDFANPKWI  
 NRHKFMFNFLDINGKKGKITLDEIVSKASDDICAKLDATPEQTKRHQDAVEAFF  
 KKMGM DYGKEVAFPEFIKGWEELAEHDLELWSQNKSTLIREWGDAVFDIFD  
 25 KDASGSISLDEWKAYGRISGICPSDEDAEKTFFKHCDLDNSGKLDVDEMTRQH  
 LGFWYTLDPTSDGLYGNFVP

Das putative Signalpeptide des Photoprotein mtClytin besitzt folgende Sequenz (SEQ ID NO: 3):

30 MQRFTNRLLSMSALRA

und weist folgende Nukleinsäuresequenz auf:

5'- atgcaaagggtttacaaatcgtcttctttccatgtcggctttacgtgca - 3'  
(SEQ ID NO 4)

5 Das Photoprotein Clytin-2 wird durch die folgende Nukleotidsequenz kodiert (SEQ ID NO: 5):

5'-

GATCTCAGCTCAACTTGCAATAAGTATCAGATCAAATTTTGCAACTCAAA  
GCAAATCATCAACTTCATCATAATGACTGACACTGCTTCAAAATACGCTG  
10 TCAAACTCAAGACCAACTTTGAAGATCCAAAATGGGTCAACAGACACAA  
ATTTATGTTCAACTTTTTGGACATTAACGGCAACGGAAAAATCACTTTGG  
ATGAAATTGTCTCCAAAGCTTCGGATGACATTTGCGCCAAACTTGGAGCT  
ACACCAGCTCAAACCCAACGTCATCAGGAAGCTGTTGAAGCTTTCTTCAA  
GAAGATTGGTTTGGATTATGGCAAAGAAGTCGAATTCACGCTTTTCGTTA  
15 ACGGATGGAAAGAAGTGGCCAAACATGACTTGAACTTTGGTCCCAAAA  
CAAGAAATCTTTGATCCGCAATTGGGGAGAAGCTGTATTCGACATTTTCG  
ACAAGGACGGAAGTGGCTCAATCAGTTTGGACGAATGGAAAACATACGG  
AGGAATCTCTGGAATCTGTCCATCAGACGAAGACGCTGAAAAGACCTTC  
AAACATTGCGATTTGGACAACAGTGGCAAACCTTGATGTTGACGAGATGA  
20 CCAGACAACATTTGGGATTCTGGTACACCTTGGACCCTAACGCTGATGGT  
CTTTATGGCAACTTTGTCCCTTAAAAACTTTTTTTTGCTGTAAATTCTTTAC  
GGGTTATTTTTTCATAATTGTCATTTGATTTTAACTTTGTTTCGGAAAATG  
AAAAATATTCTTTATTCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA - 3'

25 daraus ergibt sich eine Aminosäuresequenz von (SEQ ID NO: 6):

MTDTASKYAVKLKTNFEDPKWVNRHKFMFNFLDINGNGKITLDEIVSKASD  
DICA KL GATPAQTQRHQEAVEAFFKKIGLDYGKEVEFPFVNGWKELAKHD  
LKLWSQNKKSLIRNWGEAVFDIFDKDGSISISLDEWKTYGGISGICPSDEDAE  
30 KTFKHCDLDNSGKLDVDEMTRQHLGFWYTLDPNADGLYGNFVP

Diese Sequenzen finden sich im Sequenzlisting wieder.

### Kurze Beschreibung der Figuren

- 5      Figur 1:              Die Figur 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEX2-mtClytin.
- Figur 2:              Die Figur 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-mtClytin.
- Figur 3:              Die Figur 3 zeigt das Ergebnis der bakteriellen Expression von mtClytin, sowie die Biolumineszenzaktivität von mtClytin nach bakterieller Expression. (Y = RLU : relative light units; X = Verdünnung; schwarze Balken = mtClytin; graue Balken = Kontrolllysate).
- Figur 4:              Die Figur 4 zeigt das Ergebnis der eukaryotischen Expression von mtClytin, sowie die Biolumineszenzaktivität von mtClytin nach Expression in CHO Zellen. (Y = RLU : relative light units; X = ATP (logarithmische Darstellung in mol/l)).
- Figur 5:              Die Fig. 5 zeigt die kinetische Analyse der Biolumineszenz von mtClytin. (Y = RLU : relative light units; X = Zeit [Sekunden]).
- Figur 6:              Die Fig. 6 zeigt die kinetische Analyse der Biolumineszenz von Obelin. (Y = RLU : relative light units; X = Zeit [Sekunden]).
- Figur 7 :              Die Figur 7 zeigt das Alignment von Clytin und mtCyltin auf Aminosäureebene.
- 10      Figur 8 :              Die Figur 8 zeigt das Alignment von Clytin und mtCyltin auf Nukleinsäureebene.
- Figur 9 :              Die Figur 9 zeigt das Alignment von Clytin, mtCyltin und Clytin-2 auf Aminosäureebene.

## **Beispiele**

### **Beispiel 1**

5 Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pTriplEx2 der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pTriplEx2-mtClytin bezeichnet. Der Vektor pTriplEx2-mtClytin wurde zur Expression von mtClytin in bakteriellen Systemen verwendet.

10 Die Figur 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEX2-mtClytin .

### **Beispiel 2**

15 Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pcDNA3.1(+) der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pcDNA3-mtClytin bezeichnet. Der Vektor pcDNA3-mtClytin wurde zur Expression von mtClytin in eukaryotischen Systemen verwendet.

Die Figur 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-mtClytin .

20

### **Beispiel 3**

#### **Bakterielle Expression**

25 Die bakterielle Expression erfolgte im E. coli Stamm BL21(DE3) durch Transformation der Bakterien mit den Expressionsplasmiden pTriplEX2-mtClytin und pTriplEX2. Die transformierten Bakterien wurden in LB-Medium bei 37°C für 3 Stunden inkubiert und die Expression für 4 Stunden durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die induzierten Bakterien wurden durch  
30 Zentrifugation geerntet, in 50 mM Tris/HCl (pH 9,0) + 5 mM EDTA resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wurde anschließend für 15 Minuten

bei 13000 Umdrehungen pro Minute (16000 rcf) zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Überstand (Verdünnungen 1:5; 1:10; 1:20 und 1:50 mit Tris/HCl pH 9,0)) wurde 3 Stunden mit Coelenterazin ( $10^{-7}$  M Coelenterazine in Tris/HCl pH 9,0) im dunkeln inkubiert. Direkt nach der Zugabe von 5 mM Calciumchlorid wurde die Biolumineszenz im Luminometer gemessen. Die Integrationszeit der Messung betrug 40 Sekunden.

Die Figur 3 zeigt die Ergebnisse der Biolumineszenzmessung von mtClytin in Bakterien.

#### Beispiel 4

##### **Eukaryotische Expression**

Die konstitutive eukaryotische Expression erfolgte in CHO-Zellen durch Transfektion der Zellen mit den Expressionsplasmiden pcDNA3-mtClytin und pcDNA3.1(+) in transienten Experimenten. Hierzu wurden 10000 Zellen pro Loch in DMEM-F12 Medium auf 96 Loch Mikrotiterplatten plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Fugene 6 Kits (Roche) nach Herstellerangaben. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C in DMEM-F12 Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch 50 µl Coelenterazin ( $10^{-7}$  M Coelenterazine in PBS) ersetzt. Die Zellen wurden für 3 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend ATP (Adenosintriphosphat) bis zu einer Finalkonzentration von 1 µM zugegeben. Die Messung wurde direkt nach der Zugabe im Luminometer gestartet. Die Integrationszeit betrug 1 Sekunde, bei einer Gesamtmessdauer von 60 Sekunden.

Die Figur 4 zeigt die Ergebnisse der Biolumineszenzmessung von mtClytin in CHO Zellen.

**Beispiel 5**

**BLAST**

5 Ergebnis einer BLAST-Analyse von mtClytin auf der Aminosäureebene.

10 >emb|CAD87655.1| unnamed protein product [Clytia gregaria], Length =  
198, Score = 368 bits (945), Expect = e-101, Identities = 171/195  
(87%), Positives = 182/195 (92%)

>sp|Q08121|CLYT\_CLYGR Clytin precursor (Phialidin), pir||S28860  
clytin - hydromedusa (Clytia gregarium), emb|CAA49754.1| clytin  
[Clytia gregaria], gb|AAA28293.1| apoclytin, Length = 198, Score =  
368 bits (945), Expect = e-101, Identities = 171/195 (87%),  
15 Positives = 182/195 (92%)

>emb|CAD87658.1| unnamed protein product [synthetic construct],  
Length = 198, Score = 367 bits (943), Expect = e-101, Identities =  
170/195 (87%), Positives = 182/195 (93%)

20 >sp|Q27709|OBL\_OBELO Obelin precursor (OBL), pdb|1EL4|A Chain A,  
Structure Of The Calcium-Regulated Photoprotein Obelin, Determined  
By Sulfur Sas, gb|AAA67708.1| unnamed protein product, Length = 195,  
Score = 327 bits (837), Expect = 1e-88, Identities = 150/193 (77%),  
25 Positives = 170/193 (87%)

>emb|CAD87674.1| unnamed protein product [synthetic construct],  
Length = 195, Score = 326 bits (835), Expect = 2e-88, Identities =  
149/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)

30 >emb|CAD87672.1| unnamed protein product [synthetic construct],  
Length = 195, Score = 325 bits (834), Expect = 3e-88, Identities =  
149/193 (77%), positives = 170/193 (87%)

35 >emb|CAD87673.1| unnamed protein product [synthetic construct],  
Length = 195, Score = 325 bits (833), Expect = 4e-88, Identities =  
149/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)

>pdb|1JF0|A Chain A, The Crystal Structure Of Obelin From Obelia  
Geniculata At 1.82 A Resolution, gb|AAL86372.1|AF394688\_1 apoobelin  
[Obelia geniculata], Length = 195, Score = 325 bits (833),  
Expect = 4e-88, Identities = 149/193 (77%), Positives = 168/193  
(86%)

### Beispiel 6

#### BLAST

10

Ergebnis einer BLAST-Analyse von mtClytin auf Nukleinsäureebene :

>emb|AX702125.1| Sequence 23 from Patent WO03006497, Length = 597,  
Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 504/582 (86%)

15

>emb|AX702119.1| Sequence 17 from Patent WO03006497, Length = 597,  
Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 504/582 (86%)

20

>emb|X70221.1|CGCLYTIN C.gregaria mRNA for clytin, Length = 747,  
Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 504/582 (86%)

>gb|L13247.1|CY1APOCLYT Clytia gregarium apoclytin mRNA, complete  
cds, Length = 747, Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities  
= 504/582 (86%)

25

>emb|AX702187.1| Sequence 85 from Patent WO03006497, Length = 597,  
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)

30

>emb|AX702185.1| Sequence 83 from Patent WO03006497, Length = 597,  
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)

35

>emb|AX702183.1| Sequence 81 from Patent WO03006497, Length = 597,  
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)

>emb|AX702181.1| Sequence 79 from Patent WO03006497, Length = 597,  
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)

>emb|AX702179.1| Sequence 77 from Patent WO03006497, Length = 597,  
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)

>emb|AX702131.1| Sequence 29 from Patent WO03006497, Length = 597,  
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)

5 >emb|AX702129.1| Sequence 27 from Patent WO03006497, Length = 597,  
Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)

**Beispiel 7**

10 Die Figur 7 zeigt das Alignment von mtClytin mit Clytin (*Clytia gregaria*) auf  
Nukleinsäureebene.

**Beispiel 8**

15 Die Figur 8 zeigt das Alignment von mtClytin mit Clytin (*Clytia gregaria*) auf  
Aminosäureebene.

**Beispiel 9**

20 **Kinetische Analyse von mtClytin**

Zur kinetischen Analyse der Biolumineszenz von mtClytin, wurden CHO Zellen mit  
pcDNA3-mtClytin bzw. pcDNA-Obelin oder pcDNA3 (ohne integrierte cDNA)  
transient transfiziert. Die Transfektion und Messung erfolgte wie unter Beispiel 4  
25 beschrieben. Die Messdaten wurden für einen Zeitraum von 60 Sekunden mit einer  
Integrationszeit von 1 Sekunde erhoben.

Die Figuren 5 und 6 zeigen die Ergebnisse der kinetischen Analyse von mtClytin  
und Obelin.

**Beispiel 10**

**MITOPROT-Analyse**

5 Zur Analyse des Signalpeptides von mtClytin wurde das Computerprogramm MITOPROT verwendet (Claros et al., 1996). Folgende Photoproteine wurden analysiert: Obelin (Q27709), Aequorin (P07164), Clytin (Q08121) und mtClytin (SEQ ID NO. 2).

## Ergebnisse der Analysen:

Obelin:

5 Sequence name: OBELIN  
 Input sequence length : 195 aa

-----  
VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

10 Net charge of query sequence : -11  
 Analysed region : 11  
 Number of basic residues in targeting sequence : 3  
 Number of acidic residues in targeting sequence : 0  
 Cleavagesite : not predictable  
 15 Cleaved sequence : -

-----  
HYDROPHOBIC SCALE USED

		GES	KD	GVH1	ECS
20	H17 :	-0.624	0.259	-0.308	0.295
	MesoH :	-1.573	-0.241	-0.642	0.060
	MuHd_075 :	14.019	3.641	4.408	1.523
	MuHd_095 :	7.994	7.898	3.285	1.838
25	MuHd_100 :	13.734	9.836	5.597	2.742
	MuHd_105 :	21.195	11.755	7.339	4.117
	Hmax_075 :	-9.450	-2.800	-4.008	1.132
	Hmax_095 :	-0.963	1.837	-1.971	1.103
	Hmax_100 :	0.400	1.300	-1.942	2.240
30	Hmax_105 :	10.617	6.067	0.733	3.127

-----  
PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.1479

Aequorin:

5      Sequence name: AEQUORIN  
        Input sequence length : 196 aa

-----  
 VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

10      Net charge of query sequence                                 : -13  
          Analysed region                                                 :    3  
          Number of basic residues in targeting sequence         :    0  
          Number of acidic residues in targeting sequence         :    0  
 15      Cleavage site                                                 : not predictable  
          Cleaved sequence                                               : -

-----  
 HYDROPHOBIC SCALE USED

		GES	KD	GVH1	ECS
20	H17	0.006	0.794	-0.263	0.368
	MesoH	-1.673	-0.382	-0.703	0.048
	MuHd_075	24.326	4.153	5.947	2.450
25	MuHd_095	12.638	7.213	4.218	1.796
	MuHd_100	13.748	8.827	4.477	2.427
	MuHd_105	16.581	11.426	5.056	3.453
	Hmax_075	0.438	0.233	-2.490	1.692
	Hmax_095	0.525	-1.400	-2.394	0.674
30	Hmax_100	-0.100	-1.200	-2.292	1.550
	Hmax_105	0.500	-0.000	-2.164	1.540

-----  
 PROBABILITY

- 35 -

of export to mitochondria: 0.0148

Clytin :

5

Sequence name: CLYTIN

Input sequence length : 198 aa

10

## VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

Net charge of query sequence : -9  
 Analysed region : 32  
 Number of basic residues in targeting sequence : 6  
 15 Number of acidic residues in targeting sequence : 2  
 Cleavage site : not predictable  
 Cleaved sequence : -

20

## HYDROPHOBIC SCALE USED

		GES	KD	GVH1	ECS
	H17 :	-0.429	0.341	-0.313	0.313
	MesoH :	-1.778	-0.307	-0.718	0.053
25	MuHd_075 :	32.928	17.509	7.351	5.708
	MuHd_095 :	30.874	20.344	9.074	5.834
	MuHd_100 :	36.596	22.666	10.051	6.762
	MuHd_105 :	39.174	19.336	10.379	7.609
	Hmax_075 :	4.900	7.087	-1.223	3.684
30	Hmax_095 :	13.600	10.100	1.251	4.390
	Hmax_100 :	14.000	12.600	1.601	5.060
	Hmax_105 :	6.650	13.067	-0.468	3.920

## PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.2047

Clytin-2:

5

Sequence name: CLYTIN-2

Input sequence length : 198 aa

10

VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

Net charge of query sequence : -7  
 Analysed region : 16  
 Number of basic residues in targeting sequence : 3  
 15 Number of acidic residues in targeting sequence : 1  
 Cleavage site : not predictable  
 Cleaved sequence : -

20

HYDROPHOBIC SCALE USED

		GES	KD	GVH1	ECS
	H17 :	-0.288	0.341	-0.213	0.313
	MesoH :	-1.519	-0.206	-0.681	0.081
25	MuHd_075 :	32.594	15.092	8.192	4.075
	MuHd_095 :	36.090	19.707	8.836	6.716
	MuHd_100 :	38.617	20.269	9.682	6.851
	MuHd_105 :	30.267	16.082	8.229	5.470
	Hmax_075 :	6.533	6.417	-0.793	2.508
30	Hmax_095 :	13.600	10.100	1.251	4.390
	Hmax_100 :	13.600	10.100	1.251	4.390
	Hmax_105 :	13.417	10.150	1.612	3.862

PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.3974

mtClytin:

5

Sequence name: mtClytin

Input sequence length : 228 aa

10

VALUES OF COMPUTED PARAMETERS

Net charge of query sequence : -8  
 Analysed region : 34  
 Number of basic residues in targeting sequence : 6  
 15 Number of acidic residues in targeting sequence : 0  
 Cleavage site : 17  
 Cleaved sequence : MQRFTNRLLSMSALRA

20

HYDROPHOBIC SCALE USED

		GES	KD	GVH1	ECS
	H17 :	-0.135	0.453	-0.343	0.309
	MesoH :	-1.623	-0.215	-0.701	0.073
25	MuHd_075 :	33.394	19.322	8.634	7.593
	MuHd_095 :	34.726	19.634	8.110	8.861
	MuHd_100 :	32.825	16.596	7.376	7.520
	MuHd_105 :	28.005	19.893	7.410	7.865
	Hmax_075 :	16.683	17.733	2.851	5.763
30	Hmax_095 :	13.125	13.388	2.299	4.314
	Hmax_100 :	8.300	11.500	1.845	3.830
	Hmax_105 :	1.700	9.500	-1.171	2.390

PROBABILITY

of export to mitochondria: 0.9974

5 Die Wahrscheinlichkeit einer Translokation des analysierten Peptides in Mitochondrien steigt mit der Annäherung des berechneten Faktors an 1.

Die Analyse der Proteinsequenzen von Obelin, Aequorin, Clytin, Clytin-2 und mtClytin hat ergeben, dass nur mtClytin die Merkmale eines Proteins aufweist, dass in Mitochondrien transportiert werden kann.

10

### Beispiel 11

Die Figur 9 zeigt das Alignment von mtClytin, Clytin (*Clytia gregaria*) und Clytin-type2 auf Aminosäureebene.

15

### Literatur / Patente

US 6,495,355

US 5,541,309

20

US 5,093,240

US-0908909

US 6,152,358

JP-0176125

GB-0024357

25

WO03006497

WO200168824

Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem.* 1990 Aug 1;188(2):245-54

30 Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997); Gapped

BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs;  
*Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402

**Chiesa A, Rapizzi E, Tosello V, Pinton P, de Virgilio M, Fogarty KE, Rizzuto R.**  
Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of  
5 cell signalling. *Biochem J.* 2001 Apr 1;355(Pt 1):1-12.

**Claros, M.G., Vincens, P.** (1996); Computational method to predict  
mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem*  
241, 779-786.

**Cullen Bryan R., Malim Michael H.,** Secreted placental alkaline phosphatase as a  
10 eukaryotic reporter gene. *Methods in Enzymology.* 216:362ff

**Fagan TF, Ohmiya Y, Blinks JR, Inouye S, Tsuji FI.** Cloning, expression and  
sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-binding photoprotein, mitrocomin. *FEBS*  
*Lett.* 1993 Nov 1;333(3):301-5

**Hastings, J.W. and Morin, J.G.** (1969) Comparative biochemistry of calcium-  
15 activated photoproteins from the ctenophore, *Mnemiopsis* and the coelenterates  
*Aequorea*, *Obelia*, and *Pelagia*. *Biol. Bull.* 137, 402.

**Haddock SH, Rivers TJ, Robison BH.** Can coelenterates make coelenterazine?  
Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U*  
*SA* 2001 Sep 25;98(20):11148-51

**Inouye S, Tsuji FI.** (1994) *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the  
20 gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994  
Mar 21;341(2-3):277-80

**Inouye S, Tsuji FI.** Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-  
activated photoprotein, clytin. *FEBS Lett.* 1993 Jan 11;315(3):343-6.

**Illarionov BA, Bondar VS, Illarionova VA, Vysotski ES.** Sequence of the cDNA  
25 encoding the Ca(2+)-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia*  
*longissima*. *Gene.* 1995 Feb 14;153(2):273-4.

**Jones K, Hibbert F, Keenan M.** Glowing jellyfish, luminescence and a molecule  
called coelenterazine. *Trends Biotechnol* 1999 Dec;17(12):477-81

**Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., and Waters, J.R.** (1962) Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60, 85-103.

**Morin, J.G. and Hastings, J.W.** (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 77, 305-311.

**Phillips GN.** Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec;7(6):821-7

**Sambrook, J., Fritsch, E. Maniatis, T.** 1989, Molecular cloning. A laboratory manual Vol 1-3, *Cold Spring Harbor*, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press

**Shimomura O, Johnson FH.** Properties of the bioluminescent protein aequorin. *Biochemistry.* 1969 Oct;8(10):3991-7

**Shimomura O.,** Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symp Soc Exp Biol.* 1985;39:351-72

**Shimomura O.** Isolation and properties of various molecular forms of aequorin. *Biochem J.* 1986 Mar 1;234(2):271-7.

**Snowdowne KW, Borle AB.** Measurement of cytosolic free calcium in mammalian cells with aequorin. *Am J Physiol.* 1984 Nov;247(5 Pt 1):C396-408.

**Ward, W.W.** (1998) Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. In: *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols* (Chalfie, M. and Kain, S., eds) pp. 45-70. Wiley-Liss, Inc.

**Yang Te-Tuan, Sinai Parisa, Kitts Paul A. Kain Seven R.,** Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechnology.* 1997 23(6) 1110ff

**Patentansprüche**

1. Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - 5 a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 2 beinhaltet;
  - b) Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz beinhalten;
  - 10 c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist;
  - 15 d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
  - e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist; und
  - 20 f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist.
  - 25
2. Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - 30 a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 3 beinhaltet;

- 5                      b)    Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 4 dargestellte Sequenz beinhalten;
- c)    Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- oder Leaderpeptides aufweist;
- 10                     d)    Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
- e)    Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 90 % zu SEQ ID NO: 4 zeigen, und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- bzw. Leaderpeptides aufweist; und
- 15                     f)    Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 60 % zu SEQ ID NO: 4 zeigen, und welche ein Peptid kodieren, das die biologische Funktion eines Signal- bzw. Leaderpeptides aufweist.
- 20                     3.    Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
- 25                     a)    Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 6 beinhaltet;
- b)    Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 5 dargestellte Sequenz beinhalten;

- 5
- c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist;
- 10
- d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
- e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 5 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist; und
- 15
- f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 80 % zu SEQ ID NO: 5 zeigen, und welche ein Polypeptid kodieren, das die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist.
- 20
4. Nukleinsäure nach Anspruch 1, 2 oder 3, welche einen funktionalen Promotor 5' zur kodierenden Sequenz enthält.
5. Rekombinante DNA oder RNA Vektoren, welche Nukleinsäuren nach Anspruch 4 enthalten.
- 25
6. Organismen, die einen Vektor gemäß Anspruch 5 enthalten.
7. Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zu einer Teilsequenz eines Nukleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 1, 2 oder 3 sind.
- 30
8. Polypeptid, das durch eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, 2 oder 3 kodiert ist.

- 5
9. Verfahren zur Expression der Polypeptide gemäß Anspruch 8 in Bakterien, viralen Systemen, Hefen oder eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.
- 10
10. Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines Photoprotein Polypeptides gemäß Anspruch 8.
11. Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein mtClytin erkannt werden.
12. Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein Clytin-2 erkannt werden.
- 15
13. Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das durch SEQ ID NO:3 offenbarte Signal- bzw. Leaderpeptid erkannt werden.
- 20
14. Verwendung einer Nukleinsäure gemäß den Ansprüchen 1 bis 5 als Marker- oder Reportergen.
15. Verwendung eines Photoproteins gemäß Anspruch 8 als Marker oder Reporter.
- 25
16. Verwendung einer Nukleinsäure, welche die als SEQ ID NO: 4 dargestellte Sequenz beinhaltet, als Signal- bzw. Leadersequenz.
17. Verwendung eines Peptides, welches die als SEQ ID NO: 3 dargestellte Sequenz beinhaltet, als Signal- bzw. Leaderpeptid.

18. Verwendung gemäß Anspruch 16 oder 17, um ein an das Signal- bzw. Leaderpeptid fusioniertes Protein in Zellorganellen zu transportieren.
19. Verwendung gemäß Anspruch 18, wobei es sich bei den Zellorganellen um Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum (ER) handelt.
20. Verwendung der Polypeptide gemäß Anspruch 8 als Reporterproteine in der pharmakologischen Wirkstoffsuche.
21. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß Ansprüchen 1-3 als Reportergene in der pharmakologischen Wirkstoffsuche.

**Isoliertes Photoprotein mtClytin, sowie dessen Verwendung**

**Z u s a m m e n f a s s u n g**

Die Erfindung betrifft das Photoprotein mtClytin, dessen Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sowie die Aktivität und Verwendung des Photoproteins mtClytin.

**Figuren**

**Fig. 1**

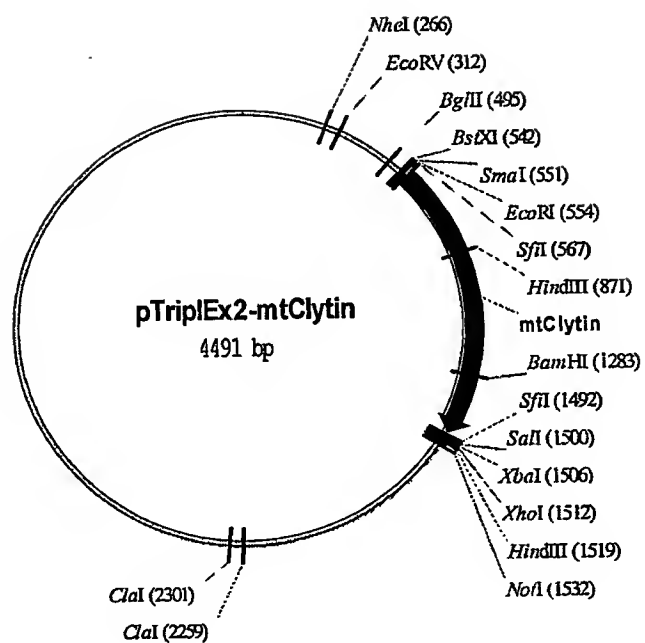


Fig. 2

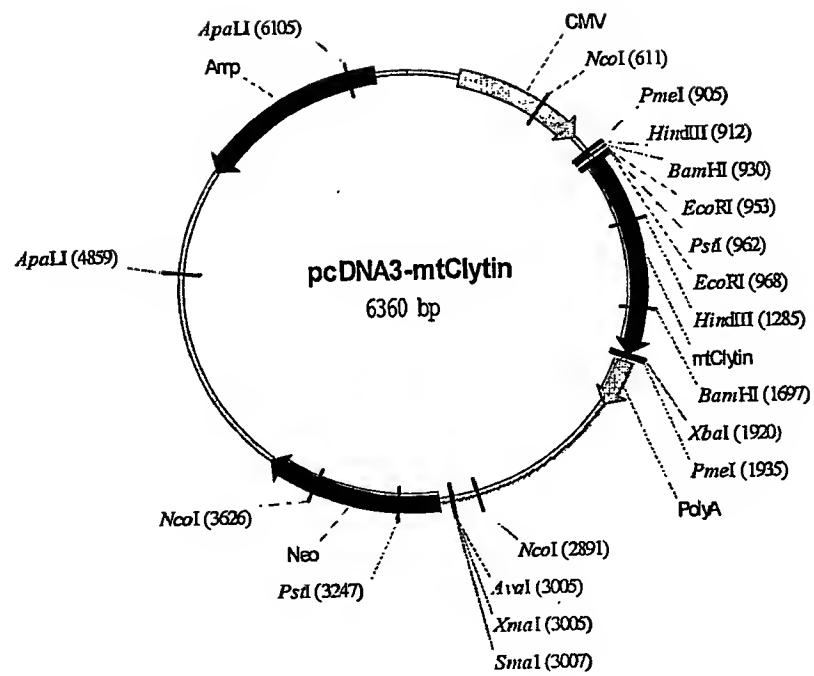


Fig. 3

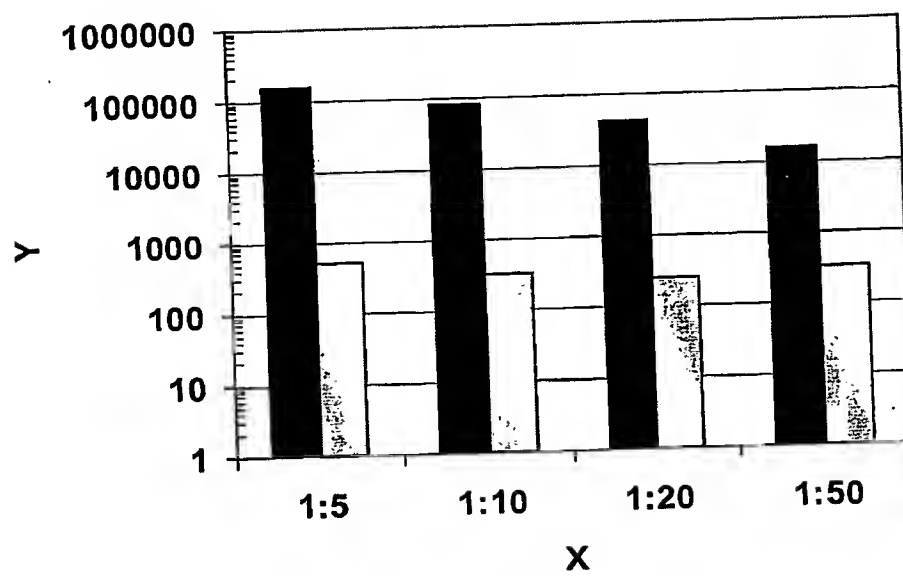


Fig. 4

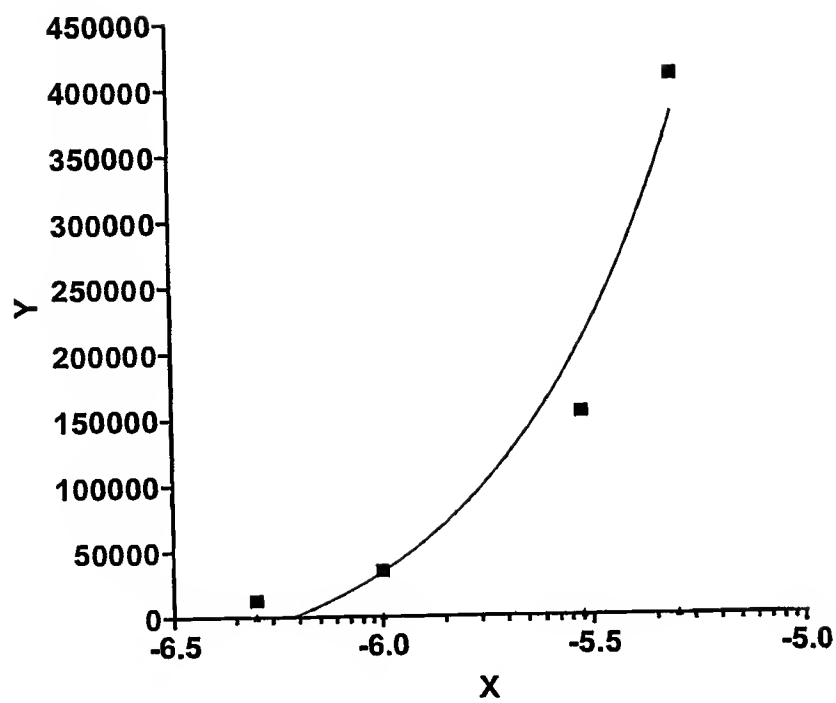


Fig. 5

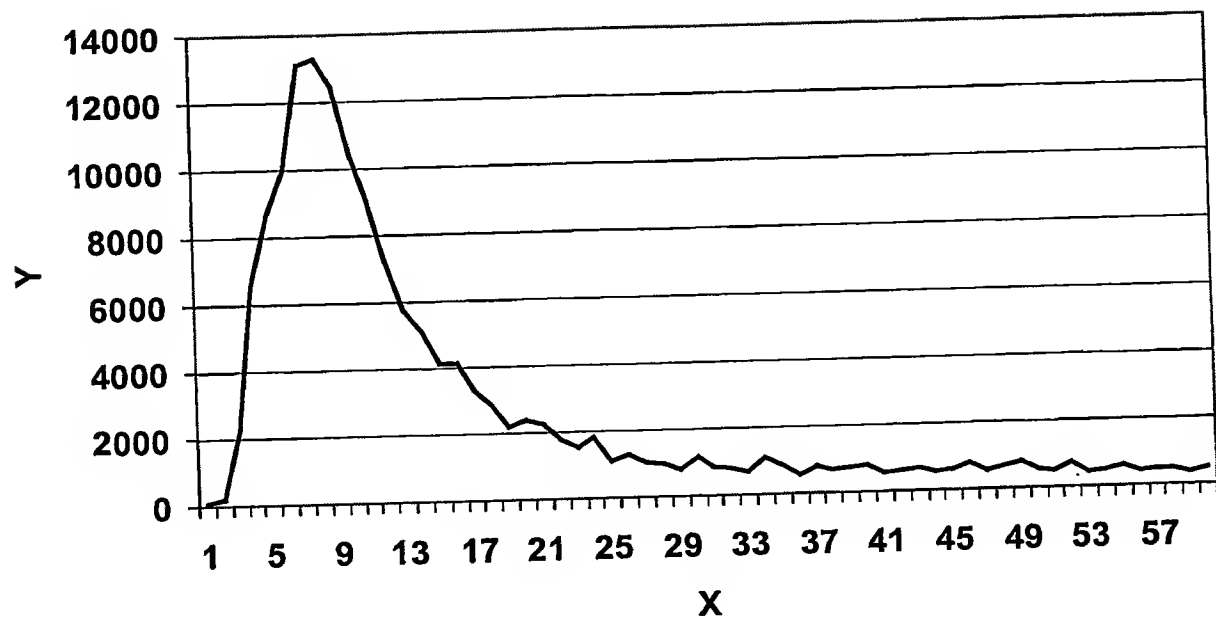


Fig. 6

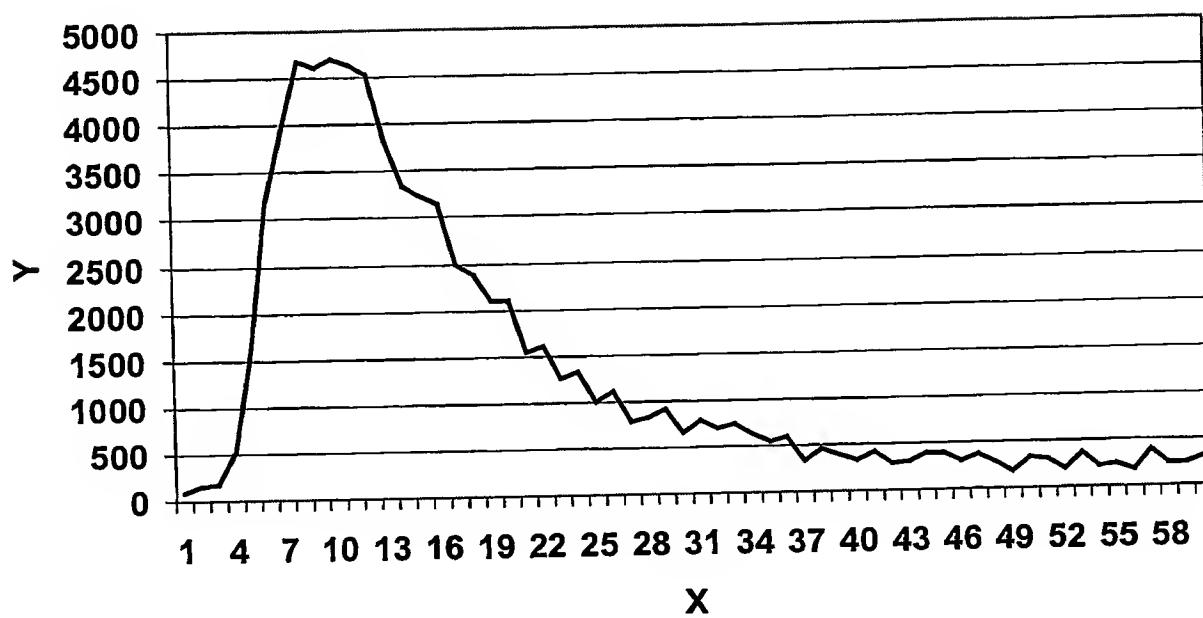


Fig. 7

1		50
Clytin	.....	
mtClytin	GACAGATAAA AAATTCAC TC CTTAGATTAT TTAGTGAATA AGAGAAAAA	
	51	100
Clytin	.....	
mtClytin	AGGATAAGAA ATCAAGATGC AAAGGTTTAC AAATCGTCTT CTTTCCATGT	
	101	150
Clytin	.....ATCA ACTTTTGCAA CTCAAAGCAA ATTTCAAAAC	
mtClytin	CGGCTTTACG TGCAAGATCA AGATT.GCAA CGCACGGCAA ATTTTCACAC	
	151	200
Clytin	TTCAACATGG CTGAC.ACTG CATCAAAATA CGCCGTCAAA CTCAGACCCA	
mtClytin	CAGCATACTC TTGGCTACAG ATTCAAAATA CGCGGTCAAA CTCGATCCTG	
	201	250
Clytin	ACTTCGACAA CCCAAAATGG GTCAACAGAC ACAAATTTAT GTTCAACTTT	
mtClytin	ATTTTGCAAA TCCAAAATGG ATCAACAGAC ACAAATTTAT GTTCAACTTT	
	251	300
Clytin	TTGGACATTA ACGGCGACGG AAAAATCACT TTGGATGAAA TCGTCTCCAA	
mtClytin	TTGGACATAA ACGGTAAGGG GAAAATCACA TTAGATGAAA TCGTCTCCAA	
	301	350
Clytin	AGCTTCGGAT GACATTTGCG CCAAACCTGG AGCAACACCA GAACAGACCA	
mtClytin	AGCTTCAGAC GACATTTGTG CTAAACTGGA TGCAACACCA GAACAGACCA	
	351	400
Clytin	AACGTCACCA GGATGCTGTC GAAGCTTTCT TCAAAAAGAT TGGTATGGAT	
mtClytin	AACGTCACCA GGATGCTGTT GAAGCCTTTT TCAAGAAAAT GGGCATGGAT	
	401	450
Clytin	TATGGTAAAG AAGTCGAATT CCCAGCTTTT GTTGATGGAT GGAAAGAACT	
mtClytin	TATGGTAAAG AAGTTGCATT CCCAGAATTT ATTAAGGGAT GGGAAGAGTT	
	451	500
Clytin	GGCCAATTAT GACTTGAAAC TTTGGTCTCA AAACAAGAAA TCTTTGATCC	
mtClytin	GGCCGAACAC GACTTGGAAC TCTGGTCTCA AAACAAAAGT ACATTGATCC	
	501	550
Clytin	GCGACTGGGG AGAAGCTGTT TTCGACATTT TTGACAAAGA CGGAAGTGGC	
mtClytin	GTGAATGGGG AGATGCTGTT TTCGACATTT TCGACAAAGA CGCAAGTGGC	

	551	600
Clytin	TCAATCAGTT TGGACGAATG GAAGGCTTAT GGACGAATCT CTGGAATCTG	
mtClytin	TCAATCAGTT TAGACGAATG GAAGGCTTAC GGACGAATCT CTGGAATCTG	
	601	650
Clytin	CTCATCAGAC GAAGACGCCG AAAAGACCTT CAAACATTGC GATTGTGGACA	
mtClytin	TCCATCAGAC GAAGACGCTG AGAAGACGTT CAAACATTGT GATTGTGGACA	
	651	700
Clytin	ACAGTGGCAA ACTTGATGTT GATGAGATGA CCAGACAACA TTTGGGATTC	
mtClytin	ACAGTGGCAA ACTTGATGTT GATGAGATGA CCAGGCAACA TTTAGGCTTC	
	701	750
Clytin	TGGTACACCT TGGACCCCAA CGCTGATGGT CTTTACGGCA ATTTTGTTC	
mtClytin	TGGTACACAT TGGATCCAAC TTCTGATGGT CTTTATGGCA ATTTTGTTC	
	751	800
Clytin	TTAAACATCG ...AAACAAA AGCCCAAAG AAGTTTTGGA AGAATTATTT	
mtClytin	CTAAGAAGCG TTCAGTTAAA AACGCTAAAC ATTGTTTCAGT TGTAATAATTA	
	801	850
Clytin	GATAC..TAT CATTTG.... ..TTACTATT TCGTAACATG CT..ATATTT	
mtClytin	TATTCATTTT CATTTTCGTAA AATTAGTATT TATAAATTTG TATCATAAAT	
	851	900
Clytin	TGTAAC.ATG CTATATT.TA AATAATTTT. ....	
mtClytin	TGTATCCATG TTGTAGACTA AATAAGACTC GGCAAAAAA AAAAAAAA	
	901	913
Clytin	.....	
mtClytin	AAAAAAAAA AAA	

Fig. 8

	1		50
mtClytin	MQRFTNRLLS MSALRARSRL QRTANFHTSI LLATDSKYAV KLDPDFANPK		
Clytin	.....	MADTASKYAV KLRPNFDNPK	
	51		100
mtClytin	WINRHKFMFN FLDINGKGKI TLDEIVSKAS DDICAKLDAT PEQTKRHQDA		
Clytin	WVNRHKFMFN FLDINGDGKI TLDEIVSKAS DDICAKLGAT PEQTKRHQDA		
	101		150
Clytin	VEAFFKKMGM DYGKEVAFPE FIKGWEELAE HDLELWSQNK STLIREWGDA		
Clytin	VEAFFKKIGM DYGKEVEFPA FVDGWKELAN YDLKLWSQNK KSLIRDWGEA		
	151		200
Clytin	VFDIFDKDAS GSISLDEWKA YGRISGICPS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD		
Clytin	VFDIFDKDGS GSISLDEWKA YGRISGICSS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD		
	201	228	
mtClytin	VDEMTRQHLG FWYTLDPDSD GLYGNFVP		
Clytin	VDEMTRQHLG FWYTLDPNAD GLYGNFVP		

Fig. 9

	1		50
mtClytin	MQRFTNRLLS MSALRARSRL QRTANFHTSI LLATDSKYAV KLDPDFANPK		
Clytin-2	.....	MTDTASKYAV KLKTNFEDPK	
Clytin	.....	MADTASKYAV KLRPNFDNPK	
	51		100
mtClytin	WINRHKFMFN FLDINGKGKI TLDEIVSKAS DDICAKLDAT PEQTKRHQDA		
Clytin-2	WVNRHKFMFN FLDINGNGKI TLDEIVSKAS DDICAKLGAT PAQTQRHQEA.		
Clytin	WVNRHKFMFN FLDINGDGKI TLDEIVSKAS DDICAKLGAT PEQTKRHQDA		
	101		150
mtClytin	VEAFFKKMGM DYGKEVAFPE FIKGWEELAE HDLELWSQNK STLIREWGDA		
Clytin-2	VEAFFKKIGL DYGKEVEFPA FVNGWKELAK HDLKLWSQNK KSLIRNWGEA		
Clytin	VEAFFKKIGM DYGKEVEFPA FVDGWKELAN YDLKLWSQNK KSLIRDWGEA		
	151		200
mtClytin	VFDIFDKDAS GSISLDEWKA YGRISGICPS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD		
Clytin-2	VFDIFDKDGS GSISLDEWKT YGGISGICPS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD		
Clytin	VFDIFDKDGS GSISLDEWKA YGRISGICSS DEDAECTFKH CDLDNSGKLD		

- 10/10 -

	201	228
mtClytin	VDEMTRQHLG	FWYTLDPTSD GLYGNEVP
Clytin-2	VDEMTRQHLG	FWYTLDPNAD GLYGNEVP
Clytin	VDEMTRQHLG	FWYTLDPNAD GLYGNEVP

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Bayer AG, BHC

&lt;120&gt; Isoliertes Photoprotein mtClytin, sowie dessen Verwendung

&lt;130&gt; Le A 36 839

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 912

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Clytia gregaria

&lt;400&gt; 1

```

gacagataaa aaattcactc cttagattat ttagtgaata agagaaaaaa aggataagaa      60
atcaagatgc aaaggtttac aaatcgtctt ctttccatgt cggctttacg tgcaagatca      120
agattgcaac gcacggcaaa ttttcacacc agcatactct tggctacaga ttcaaaatac      180
gcggtcaaac tcgatcctga ttttgcaaat ccaaaatgga tcaacagaca caaatattatg      240
ttcaactttt tggacataaa cggtaagggg aaaatcacat tagatgaaat cgtctccaaa      300
gcttcagacg acatttgtgc taaactggat gcaacaccag aacagaccaa acgtcaccag      360
gatgctgttg aagccttttt caagaaaatg ggcattggatt atggtaaaga agttgcattc      420
ccagaattta ttaagggatg ggaagagttg gccgaacacg acttggaact ctggtctcaa      480
aacaaaagta cattgatccg tgaatgggga gatgctgttt tcgacatttt cgacaaagac      540
gcaagtggct caatcagttt agacgaatgg aaggcttacg gacgaatctc tggaatctgt      600
ccatcagacg aagacgctga gaagacgttc aaacattgtg atttggaaca cagtggcaaa      660
cttgatgttg atgagatgac caggcaacat ttaggcttct ggtacacatt ggatccaact      720
totgatggtc tttatggcaa ttttgttccc taagaagcgt tcagttaaaa acgctaaaca      780
ttgttcagtt gtaaaattat attcattttc atttcgtaaa attagtattt ataaatttgt      840
atcataaatt gtatccatgt ttagactaa ataagactcg gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      900
aaaaaaaaaa aa                                     912

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 228

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Clytia gregaria

&lt;400&gt; 2

Met Gln Arg Phe Thr Asn Arg Leu Leu Ser Met Ser Ala Leu Arg Ala

1

5

10

15

Arg Ser Arg Leu Gln Arg Thr Ala Asn Phe His Thr Ser Ile Leu Leu  
                   20                                  25                                  30  
 Ala Thr Asp Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Asp Pro Asp Phe Ala Asn  
                   35                                  40                                  45  
 Pro Lys Trp Ile Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu Asp Ile  
                   50                                  55                                  60  
 Asn Gly Lys Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys Ala Ser  
                   65                                  70                                  75                                  80  
 Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Asp Ala Thr Pro Glu Gln Thr Lys Arg  
                                   85                                  90                                  95  
 His Gln Asp Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Met Gly Met Asp Tyr  
                                   100                                  105                                  110  
 Gly Lys Glu Val Ala Phe Pro Glu Phe Ile Lys Gly Trp Glu Glu Leu  
                                   115                                  120                                  125  
 Ala Glu His Asp Leu Glu Leu Trp Ser Gln Asn Lys Ser Thr Leu Ile  
                                   130                                  135                                  140  
 Arg Glu Trp Gly Asp Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp Ala Ser  
                                   145                                  150                                  155                                  160  
 Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Ala Tyr Gly Arg Ile Ser Gly  
                                   165                                  170                                  175  
 Ile Cys Pro Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His Cys Asp  
                                   180                                  185                                  190  
 Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg Gln His  
                                   195                                  200                                  205  
 Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Thr Ser Asp Gly Leu Tyr Gly  
                                   210                                  215                                  220  
 Asn Phe Val Pro  
 225

<210> 3  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Clytia gregaria

<400> 3  
 Met Gln Arg Phe Thr Asn Arg Leu Leu Ser Met Ser Ala Leu Arg Ala  
                   1                                  5                                  10                                  15

<210> 4  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Clytia gregaria

&lt;400&gt; 4

atgcaaaggt ttacaaatcg tcttctttcc atgtoggott tacgtgca

48

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 791

&lt;212&gt; DNA

<213> *Clytia gregaria*

&lt;400&gt; 5

gatctcagct caacttgcaa taagtatcag atcaaatttt gcaactcaaa gcaaatacatc	60
aacttcatca taatgactga cactgcttca aaatacgtcg tcaaactcaa gaccaacttt	120
gaagatccaa aatgggtcaa cagacacaaa tttatgttca actttttgga cattaacggc	180
aacggaaaaa tcaactttgga tgaaattgtc tccaaagctt cggatgacat ttgcgccaaa	240
cttggaagct caccagctca aaccaaacgt catcaggaag ctgttgaagc tttcttcaag	300
aagattgggt tggattatgg caaagaagtc gaattcccag ctttcgttaa cggatggaaa	360
gaactggcca aacatgactt gaaactttgg tccaaaaaca agaaatcttt gatccgcaat	420
tggggagaag ctgtattoga cattttcgac aaggacggaa gtggctcaat cagtttggac	480
gaatggaaaa catacggagg aatctctgga atctgtccat cagacgaaga cgctgaaaag	540
accttcaaac attgogattt ggacaacagt ggcaaacttg atgttgacga gatgaccaga	600
caacatttgg gattctggta caccttggac cctaacgtcg atggtcttta tggcaacttt	660
gtcccttaaa aacttttttt gctgtaaatt ctttacgggt tattttttca taattgtcat	720
ttgattttaa ctttgtttcg gaaaatgaaa aatattcttt attcagaaaa aaaaaaaaaa	780
aaaaaaaaa a	791

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 198

&lt;212&gt; PRT

<213> *Clytia gregaria*

&lt;400&gt; 6

Met Thr Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asn Phe	
1	15
Glu Asp Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu	
20	30
Asp Ile Asn Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys	
35	45
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Ala Gln Thr	
50	60
Gln Arg His Gln Glu Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Leu	
65	80
Asp Tyr Gly Lys Glu Val Glu Phe Pro Ala Phe Val Asn Gly Trp Lys	
85	95

Glu Leu Ala Lys His Asp Leu Lys Leu Trp Ser Gln Asn Lys Lys Ser  
100 105 110  
Leu Ile Arg Asn Trp Gly Glu Ala Val Phe Asp Ile Phe Asp Lys Asp  
115 120 125  
Gly Ser Gly Ser Ile Ser Leu Asp Glu Trp Lys Thr Tyr Gly Gly Ile  
130 135 140  
Ser Gly Ile Cys Pro Ser Asp Glu Asp Ala Glu Lys Thr Phe Lys His  
145 150 155 160  
Cys Asp Leu Asp Asn Ser Gly Lys Leu Asp Val Asp Glu Met Thr Arg  
165 170 175  
Gln His Leu Gly Phe Trp Tyr Thr Leu Asp Pro Asn Ala Asp Gly Leu  
180 185 190  
Tyr Gly Asn Phe Val Pro  
195

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**